Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 9, No.2, 2018, p. 139-150
DOI: 10.22067/ijpr.v9i2.59524

پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۹ شمارۀ۲، نیمۀ دوم ۱۳۹۷، صفحۀ ۱۵۰-۱۳۹

بررسی روند تغییرات عوامل فلورسانس کلروفیل در طی تنش یخزدگی در دو توده باقلا (*Vicia faba* L.)

جعفر نباتی[1]*، احمد نظامی[2]، علیرضا حسن‌فرد[3] و ژاله حقیقت شیشوان[4]

۱- استادیار فیزیولوژی گیاهان زراعی، پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی و پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، nezami@um.ac.ir
۳- دانشجوی دکتری علوم علف‌های هرز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، alireza.hasanfard@yahoo.com
۴- دانشجوی دکتری زراعت گرایش فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، haghighat.zhaleh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲۳

چکیده

فتوسیستمII در دستگاه فتوسنتزی، حساس‌ترین مؤلفه به تنش دمایی است. به‌منظور ارزیابی تحمل دو توده باقلای بروجرد و نیشابور به تنش یخزدگی (دمای ۰، ۴-، ۸-، ۱۲-، ۱۶-، ۲۰-، ۲۴-درجه سانتی‌گراد) آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار در سال ۱۳۹۴ در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. عوامل فلورسانس کلروفیل قبل، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ساعت پس از اعمال یخزدگی اندازه‌گیری شد. درصد بقای توده‌ها نیز سه هفته پس از اعمال تیمارهای دمایی تعیین شد. بیشینه فلورسانس برگ سازگار شده به نور (F'_m)، در توده بروجرد نسبت به توده نیشابور چهار درصد بیشتر بود. مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل با کاهش دما از صفرتا ۱۲°C- تغییر قابل‌ملاحظه‌ای نشان ندادند، ولی با کاهش دما از ۱۲- به ۱۶°C- عوامل فلورسانس کلروفیل روند کاهشی پیدا کردند و در ۲۴°C- به حداقل مقدار خود رسیدند. کاهش عوامل فلورسانس کلروفیل ازجمله بیشینه کارآیی پتانسیل فتوسیستم F'_v/F'_m تا ۲۴ ساعت پس از اعمال یخزدگی با شیب تندی ادامه پیدا کرد و پس از آن با شیب ملایم افزایش یافت، اما F'_m، ۷۲ساعت پس از اعمال یخزدگی به مقدار قبل از تنش نرسید. با افزایش شدت یخزدگی درصد بقای نمونه‌ها کاهش یافت، به‌طوری‌که در دمای ۱۲°C- درصد بقا به ۸۳درصد رسید با کاهش دما از ۱۲- به ۱۶°C- درصد بقا به‌شدت کاهش یافت، در این دما در توده بروجرد هیچ گیاهی باقی نماند و در توده نیشابور تنها پنج درصد از گیاهان قادر به تحمل این شدت از تنش یخزدگی بودند. ضریب رگرسیونی بالایی بین F'_v/F'_m و درصد بقا در توده بروجرد (R^2=۰/۹۹) و نیشابور (R^2=۰/۹۸) مشاهده شد. به طور کلی این مطالعه نشان داد که باقلا قادر به تحمل سرما تا دمای ۱۲°C- است و با استفاده از شاخص‌های کلروفیل فلورسانس پس از تنش یخزدگی می‌توان میزان خسارت را در این گیاه تخمین زد.

واژه‌های کلیدی: بقا، عملکرد کوانتومی، فتوسیستم، کارآیی فتوسیستم

مقدمه

باقلا (*Vicia faba* L.) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی دنیا و سومین لگوم دومنظوره (دانه‌ای و علوفه‌ای) بعد از سویا (*Glycine max*) و نخودفرنگی (*Pisum sativum* L) است (Singh *et al*., 2012). بر اساس آمار سازمان غذا و کشاورزی (FAO, 2009)، درحال‌حاضر این گیاه در ۵۸کشور دنیا کشت می‌شود. تثبیت نیتروژن توسط باقلا موجب افزایش حاصلخیزی خاک برای گیاه زراعی بعدی می‌گردد. هدف اصلی برنامه‌های اصلاحی در باقلا بهبود و توسعه مقاومت یا تحمل آن به تنش‌های زنده و غیرزنده است (Singh *et al*., 2012).

توانایی گیاهان در تحمل به دماهای پایین نقش حیاتی در تولید جهانی بسیاری از محصولات مهم کشاورزی ایفا می‌کند (Vaclavik *et al*., 2013). همچنین تحمل به یخزدگی از عوامل مهم در تعیین توزیع جغرافیایی گونه‌های گیاهی، مناطق رشد و عملکرد بسیاری از گیاهان زراعی است. کاهش بیش از حد درجه حرارت در بسیاری از گیاهان سبب بروز خسارت و کاهش رشد و تولید گیاه می‌گردد (Mishra *et al*., 2014). در مناطق خشک و نیمه‌خشک، گیاهان پاییزه غالباً در معرض تنش سرما و یخزدگی قرار می‌گیرند. عامل اصلی که منجر به خسارت زمستانه در این گیاهان می‌شود، با دمای محیط (هوا و خاک) در ارتباط است (Badeck & Rizza, 2015).

*نویسنده مسئول: jafarnabati@ferdowsi.um.ac.ir

مطالعات متعددی در رابطه با تحمل به سرما در حبوبات سرمادوست مانند نخود (*Cicer arietinum* L.) (Porsa *et al*., 2016)، نخودفرنگی (Zhang *et al*., 2016) و عدس (*Lens culinaris* Medik.) (Nezami *et al*., 2011) برای کشت پاییزه این محصولات در مناطق معتدله و مدیترانه‌ای انجام شده است. مطالعات نشان داده است که کشت پاییزه موجب افزایش عملکرد حبوبات می‌شود (Nezami *et al*., 2011; Porsa *et al*., 2016). بررسی کشت پاییزه نخود حاکی از افزایش عملکرد آن به دلیل استقرار بهتر در پاییز و بهره‌بردن از نزولات جوی و اجتناب از تنش خشکی در اواخر بهار می‌شود (Porsa *et al*., 2016). همچنین کشت پاییزه عدس موجب افزایش حدود چهار برابری عملکرد این گیاه نسبت به کشت بهاره آن شد (Nezami *et al*., 2011). در گذشته محققان توجه زیادی به تأثیر دمای پایین بر گیاهان داشته‌اند، اما متأسفانه اطلاعات کمی در ارتباط با اثر سرما بر باقلا موجود است.

تحمل به یخ‌زدگی یک صفت کمّی چندژنی است و خوسرمایی در گیاهی مانند آرابیدوبسیس (*Arabidopsis thaliana*) موجب تغییر در بیان صدها ژن (Vogel *et al*., 2005) و تغییر در محتوای سلولی تعداد زیادی از متابولیت‌های قابل اندازه‌گیری شده است (Kaplan *et al*., 2007).

یکی از مهم‌ترین پیش‌شرط‌های لازم برای تجزیه و تحلیل تنوع فنوتیپی در گیاهان توانایی تعیین دقیق تحمل به انجماد گیاه و پاسخ سازگاری به سرما است. به‌طور کلی محققان به این اجماع رسیده‌اند که محل اصلی خسارت یخ‌زدگی در گیاهان غشای سلولی است (Ehlert & Hincha, 2008).

از طرف دیگر کلروپلاست‌ها به‌عنوان یک اندامک حساس به دما نقش حیاتی در فتوسنتز ایفا می‌کنند (Krause & Santarius, 1975). در طول تنش یخ‌زدگی و ذوب ممکن است به غشاء کلروپلاست آسیب وارد شود که این امر توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داده شده است (Hincha *et al*., 1992). در نتیجه فعالیت فتوسنتزی به دلیل عدم فعالیت انتقال غیرچرخه‌ای الکترون غیرفعال می‌شود (Krause *et al*., 1988).

فتوسیستم II در دستگاه فتوسنتزی، حساس‌ترین مؤلفه به تنش دمایی است (Zhou *et al*., 2015). زمانی که گیاه در معرض تنش دمایی قرار می‌گیرد، اولین محلی که در گیاه صدمه می‌بیند فتوسیستم II است (Mathur *et al*., 2011). اندازه‌گیری کارایی فتوسیستم II شامل عملکرد کوانتومی فتوسیستمII، ماکزیمم عملکرد کوانتومی فتوسیستمII و خاموشی غیرفتوشیمیایی توسط کلروفیل فلورسانس یک روش کارآمد و غیرتخریبی برای ارزیابی میزان خسارت در فتوسیستمII می‌باشد (Baker, 2008). نسبت فلورسانس متغیر ($F'_v=F'_m-F'_o$) به بیشینه فلورسانس برگ سازگار شده به روشنایی (F'_m) ، برآوردی از بیشینه کارایی فتوسیستمII (F'_v/F'_m) را فراهم می‌کند (Butler, 1978) که یکی از عوامل فلورسانس کلروفیل تحت تأثیر تنش دمایی است. کاهش F'_v/F'_m به‌طور متوالی زمانی که گیاهان تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی مانند تنش‌های دمایی قرار می‌گیرند، مشاهده می‌شود (Molina-Bravo *et al*., 2011; Sharma *et al*., 2012). دلیل کاهش F'_v/F'_m تحت تأثیر تنش، افزایش فرود انرژی الکترون برانگیخته‌شده از مسیر غیرفتوشیمیایی[1] است که منجر به کاهش F'_m و درنتیجه آن غیرفعال‌شدن مراکز واکنش فتوسیستمII شده و به دنبال آن مقدار F'_o (فلورسانس پایه یا کمینه برگ سازگار شده به روشنایی) افزایش می‌یابد (Baker, 2008).

بنابراین متابولیسم برگ‌ها در گیاهانی که در معرض تنش یخ‌زدگی قرار می‌گیرند، به‌شدت کاهش یافته و خسارت نوری به PSII اجتناب‌ناپذیر است. به‌علاوه گیاهانی که تحت تنش یخ‌زدگی قرار گرفته‌اند، در مرحله بازیابی (در شدت تشعشع بالا) بایستی انرژی اضافی را نیز مدیریت کنند، در غیر این صورت به دستگاه فتوسنتزی و فعالیت‌های متابولیکی خسارت وارد می‌شود. همچنین مشاهده شده که نور از طریق فتوسنتز، انرژی لازم برای القای تحمل به یخ‌زدگی در گیاهان تأمین می‌کند (Dexter,1993)؛ بنابراین با اندازه‌گیری نسبت F'v/F'm میزان تحمل به تنش یخ‌زدگی در گیاهان قابل ارزیابی است (Baker, 2008).

مجموع سطح زیرکشت باقلا در ایران حدود ۲۰هزار هکتار و میزان تولید حدود آن ۲۴هزار تن در سال است (FAO, 2009). با توجه به این‌که در بسیاری از مناطق غربی و شرق ایران کشت باقلا را در پاییز انجام می‌گیرد، قسمتی از دوره رشد آن با سرما مواجه خواهد شد که مطالعه تحمل به سرما و مکانیسم‌های آن در اصلاح ارقام متحمل به سرما مفید خواهد بود؛ بنابراین این آزمایش با هدف بررسی روند تغییرات عوامل فلورسانس کلروفیل پس از تنش یخ‌زدگی در تعیین میزان تحمل به یخ‌زدگی دو توده باقلا به‌عنوان روشی سریع و غیرتخریبی انجام شد.

[1] Non-photochemical quenching

مواد و روش‌ها

این مطالعه در پاییز و زمستان ۱۳۹۴ در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. در این آزمایش دو توده باقلای بروجرد و نیشابور در معرض هفت دمای یخ‌زدگی (صفر،۴-،۸-،۱۲-،۱۶-، ۲۰-،۲۴-درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند.

کشت در نیمه اول آبان‌ماه۱۳۹۴ در گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۲سانتی‌متر حاوی خاک مزرعه، خاک‌برگ و ماسه (به نسبت ۱:۱:۱) انجام شد. تعداد هشت بذر در هر گلدان کشت گردید و پس از سبزشدن پنج بوته در هر گلدان جهت اعمال تیمار نگهداری شد. جهت اعمال خوسرمایی گیاهان در شرایط طبیعی رشد کردند. بعد از رشد گیاهان و رسیدن به مرحله چهار تا شش برگی، گلدان‌ها ۲۴ساعت قبل از تیمار یخ‌زدگی آبیاری و سپس به فریزر ترموگرادیان جهت اعمال تنش یخ‌زدگی منتقل شدند. دمای فریزر در شروع آزمایش پنج درجه سانتی‌گراد بود. پس از قرار دادن نمونه‌ها (گلدان‌های حاوی گیاه) دما با سرعت دو درجه سانتی‌گراد در ساعت کاهش پیدا کرد. جهت جلوگیری از پدیده فراسرمایی و ایجاد هستک یخ در گیاهچه‌ها (Lindowetal, 1982) در دمای ۲/۵-درجه سانتی‌گراد روی گیاهچه‌ها محلول باکتری‌های ایجادکننده هستک یخ [1](INAB) به‌طوری‌که قشر نازکی روی برگ‌ها قرار گیرد، پاشیده شد. هر یک از نمونه‌ها در دمای مورد نظر به مدت یک ساعت نگهداری و سپس از فریزر خارج و بلافاصله به اتاقک رشد با دمای ۲±۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و به مدت ۲۴ساعت نگهداری و سپس به گلخانه منتقل شدند.

جهت اندازه‌گیری عوامل فلورسانس کلروفیل شامل کمینه بازتاب فلورسانسی از برگ سازگار شده به روشنایی (F'o)، بیشینه فلورسانس برگ سازگار شده به نور (F'_m)، فلورسانس متغیر (F'_v) و بیشینه‌ی کارایی پتانسیل فتوسیستمII (F'_v/F'_m)، از جوان‌ترین برگ کاملاً توسعه‌یافته از نوک گیاه در سه بوته از دستگاه فلورومتر[2] استفاده شد. قبل از قرارگیری نمونه‌ها در معرض دماهای یخ‌زدگی عوامل کلروفیل فلورسانس برگ اندازه‌گیری گردید. روند تغییرات عوامل فلورسانس کلروفیل در هر تیمار دمایی بر اساس زمان خارج‌شدن آن‌ها از فریزر ترموگرادیان در ۳، ۶، ۱۲،۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تنش یخ‌زدگی اندازه‌گیری شد.

پس از ۲۱ روز، درصد بقاء گیاهان نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد بقاء از طریق نسبت تعداد گیاهان زنده پس از اعمال تیمار یخ‌زدگی به تعداد گیاهان قبل از تیمار یخ‌زدگی ضرب در ۱۰۰ محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Minitab و Excel و مقایسه میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بین دو توده باقلای بروجرد و نیشابور ازنظر کمینه فلورسانس برگ سازگارشده به روشنایی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). بیشینه فلورسانس برگ سازگارشده به نور در دو توده باقلا تفاوت معنی‌داری نشان دادند (جدول ۱). نتایج نشان داد میانگین F'_m توده بروجرد به میزان چهار درصد بیشتر از توده نیشابور بود (جدول ۲). فلورسانس متغیر نیز اختلاف معنی‌داری بین دو توده داشت (جدول ۱). میزان F'v در توده بروجرد پنج درصد بیشتر از توده نیشابور بود (جدول۲). ازنظر بیشینه‌کارآیی پتانسیل فتوسیستمII بین توده‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول۱) و توده بروجرد چهار درصد F'_v/F'_m بیشتری نسبت به توده نیشابور داشت (جدول ۲).

بررسی این نتایج نشان می‌دهد که هر دو توده باقلا دارای F'_o مشابهی هستند، به این مفهوم که مقدار فلورسانس در زمانی که پذیرنده کوئینون A در فتوسیستمII در بالاترین وضعیت اکسیداسیونی قرار دارد (مراکز فتوسیستمII باز هستند)، مشابه است؛ اما F'_m که بیانگر مقدار فلورسانس در زمانی است که کوئینون A در فتوسیستمII در بالاترین مقدار شرایط احیایی قرار دارد (مراکز فتوسیستمII بسته هستند) در توده بروجرد بیشتر بود. بالابودن این عامل بیانگر توان تحمل بیشتر در شرایط نامساعد محیطی است. F'_v که نشان‌دهنده ظرفیت فتوسیستمII در راه‌اندازی ابتدای مسیر فتوشیمیایی (احیای نوری QA) است نیز در توده بروجرد بیشتر از توده نیشابور بود. در نهایت F'_v/F'_m که برآیند تمام مؤلفه‌های کلروفیل فلورسانس است و تخمینی از بیشینه کارایی در فتوسیستمII را در یک شدت نور مشخص فراهم می‌کند، در توده بروجرد بیشتر از توده نیشابور بود.

اثر دمای یخ‌زدگی بر عوامل کلروفیل فلورسانس از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۱). مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل با کاهش دما از صفر تا ۱۲- درجه سانتی‌گراد تغییر قابل‌ملاحظه‌ای نشان ندادند. با کاهش دما از ۱۲- به ۱۶- درجه سانتی‌گراد

[1] Ice nucleation active bacteria

[2] MINI-PAM Portable Chlorophyll Fluorometer, WALZ, German

عوامل فلورسانس کلروفیل رونـد کاهشـی پیـدا کردنـد و در ۲۴- درجه سانتی‌گراد به حداقل مقدار خود رسیدند (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس (سطح احتمال) مؤلفه‌های کلروفیل فلورسانس برگ دو توده باقلا تحت تأثیر دماهای یخزدگی در دوره پس از تنش

Table 1. Analysis of variance (P value) study traits under freezing temperature after stress

Source of varation منابع تغییرات	df	F'o	F'm	F'v	F'v/F'm
Replication تکرار	3	0.001	0.004	0.083	0.052
Ecotype (Ec) توده	1	0.171[ns]	0.024[*]	0.022[*]	0.015[*]
Temperature (Te) دما	6	0.001[**]	0.001[**]	0.001[**]	0.001[**]
Ec×Te	6	0.001[**]	0.001[**]	0.001[**]	0.006[**]
Time (Ti) زمان	6	0.001[**]	0.001[**]	0.001[**]	0.001[**]
Ec×Ti	6	0.163[ns]	0.421[ns]	0.275[ns]	0.746[ns]
Ti×Te	36	0.001[**]	0.001[**]	0.001[**]	0.001[**]
Error خطا	327				

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال یک و پنج درصد

F'o: کمینه فلورسانس برگ سازگارشده به روشنایی، F'm: بیشینه فلورسانس برگ سازگارشده به نور، F'v: فلورسانس متغیر و F'v/F'm: بیشینه‌ی کارآیی پتانسیل فتوسیستمII

* and ** significant at levels of 5% and 1% and ns not significant at levels of 5%. F'o: minimum fluorescence light-acclimated leaves, F'm: maximum fluorescence light-acclimated leaves, F'v: variable fluorescence, and F'v/F'm: maximum quantum yield of PSII photosystems light-acclimated leaves

جدول ۲- مقایسه میانگین مؤلفه‌های کلروفیل فلورسانس برگ دو توده باقلای بروجرد و نیشابور تحت تأثیر تنش یخزدگی

Table 2. Mean comparison of chlorophyll fluorescence parameters of two fava bean ecotypes under freezing stress

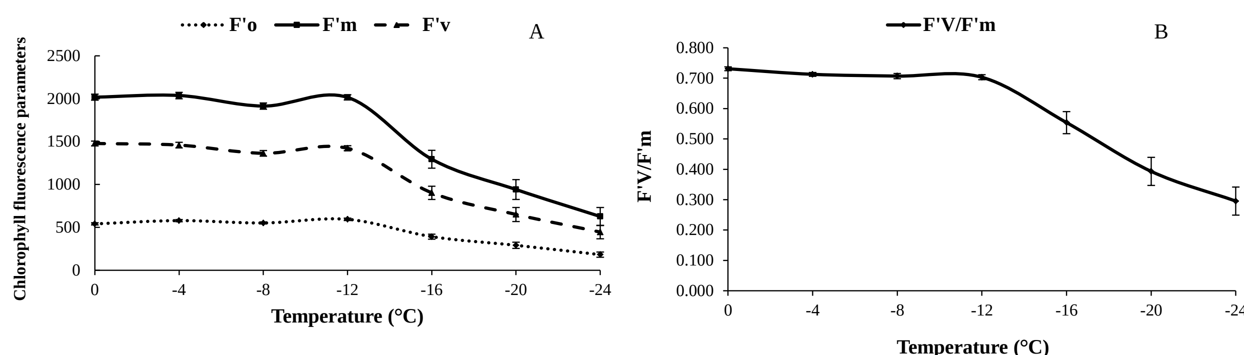
Ecotype توده	F'o	F'm	F'v	F'v/F'm
Borujerd بروجرد	453[a]	1582[a]	1129[a]	0.596[a]
Neyshabur نیشابور	440[a]	1517[b]	1077[b]	0.574[b]

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر صفت در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

F'o: کمینه فلورسانس برگ سازگار شده به روشنایی، F'm: بیشینه فلورسانس برگ سازگار شده به نور، F'v: فلورسانس متغیر و F'v/F'm: بیشینه‌ی کارایی پتانسیل فتوسیستمII

Means with similar letters in each treatment are not significantly different (P≤0.05).

F'o: minimum fluorescence light-acclimated leaves, F'm: maximum fluorescence light-acclimated leaves, F'v: variable fluorescence, and F'v/F'm: maximum quantum yield of PSII photosystems light-acclimated leaves



شکل ۱- مقایسه تغییرات عوامل فلورسانس کلروفیل

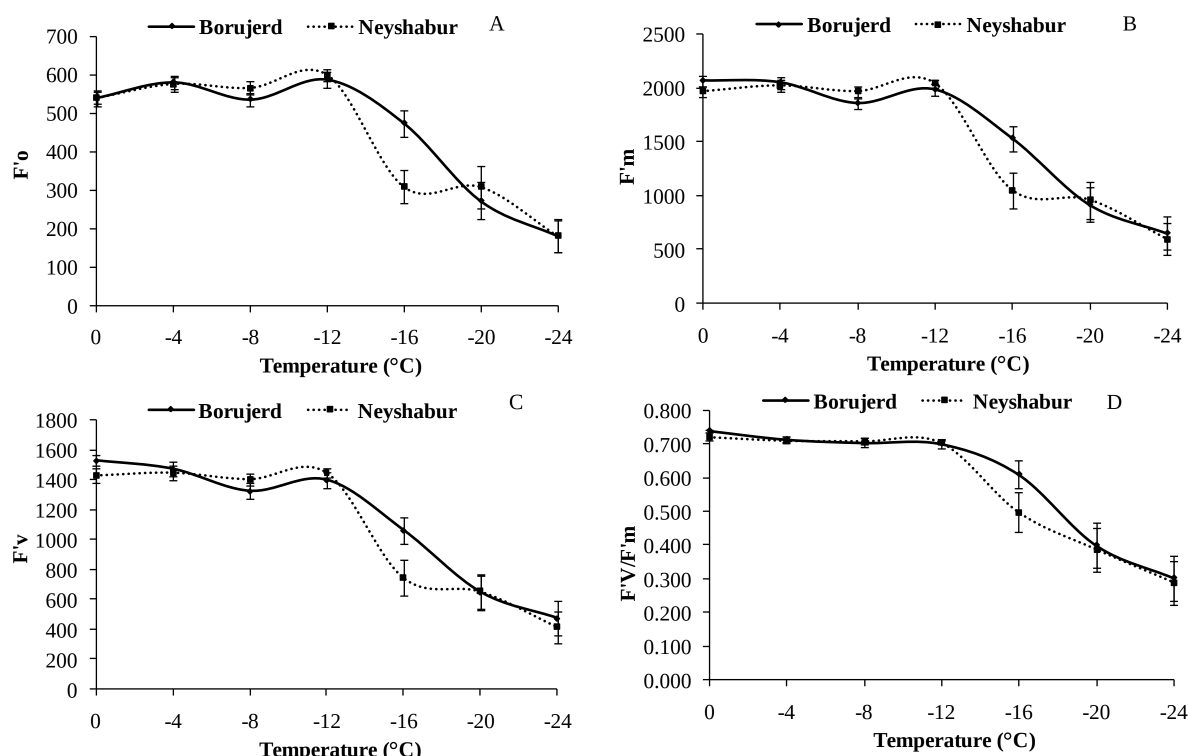
(کمینه فلورسانس برگ سازگارشده به روشنایی (F'o)، بیشینه فلورسانس برگ سازگار شده به نور (F'm)، فلورسانس متغیر (F'v) (A) و بیشینه‌ی کارآیی پتانسیل فتوسیستمII (F'v/F'm) (B)) در دو توده باقلای بروجرد و نیشابور در سطوح مختلف دمای یخزدگی

خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد هستند.

Fig. 1. Comparison of chlorophyll fluorescence parameters

(minimum fluorescence light-acclimated leaves (F'o), maximum fluorescence light-acclimated leaves (F'm), variable fluorescence (F'v) (A), and maximum quantum yield of PSII photosystems light-acclimated leaves (F'v/F'm) (B)) in two fava bean ecotypes under freezing stress. Bar lines are the standard error.

برهمکنش توده و دمای یخزدگی بر عوامل فلورسانس کلروفیل نشان داد که در هر دو توده باقلای بروجرد و نیشابور اثر کاهش دما تا ۱۲- درجه سانتی‌گراد تقریباً یکنواخت بود (شکل ۲). شیب کاهش تمامی عوامل فلورسانس کلروفیل به‌خصوص F'_v/F'_m از دمای ۱۲- تا ۱۶- در توده نیشابور بیشتر از توده بروجرد بود، به‌نحوی‌که مقدار کاهش F'_v/F'_m در توده بروجرد ۱۳درصد و در توده نیشابور ۳۰درصد بود. با کاهش دما از ۱۶- به ۲۰- و ۲۴- درجه سانتی‌گراد شیب کاهشی F'_v/F'_m در هر دو توده نسبتاً مشابه بود (شکل ۲).



شکل ۲- عوامل فلورسانس کلروفیل

(کمینه فلورسانس برگ سازگار شده به روشنایی (F'o) (A)، بیشینه فلورسانس برگ سازگارشده به نور (F'_m) (B)، فلورسانس متغیر (F'_v) (C) و بیشینه‌ی کارآیی پتانسیل فتوسیستمII (F'_v/F'_m) (D)) در دو توده باقلای بروجرد و نیشابور در سطوح مختلف تنش یخزدگی

خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد هستند.

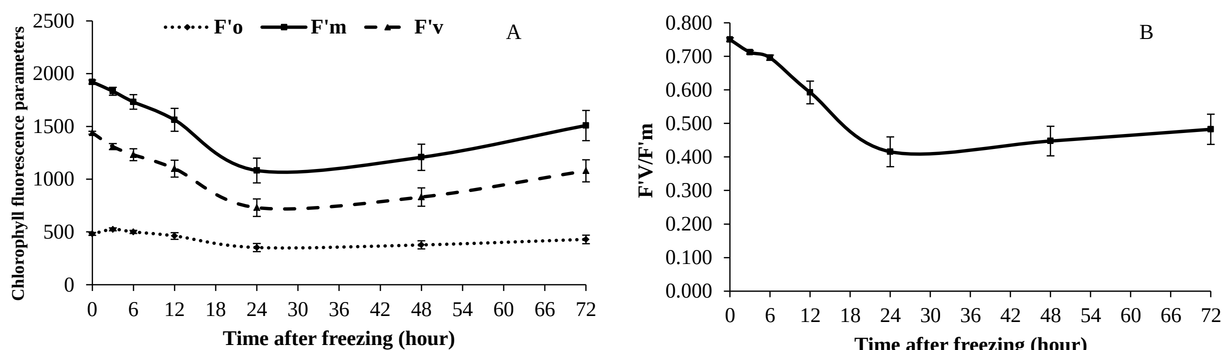
Fig. 2. Chlorophyll fluorescence parameters

(minimum fluorescence light-acclimated leaves (F'o) (A), maximum fluorescence light-acclimated leaves (F'_m) (B), variable fluorescence (F'_v) (C), maximum quantum yield of PSII photosystems light-acclimated leaves (F'_v/F'_m) (D) of two fava bean ecotypes under freezing stress. Bar lines are the standard error.

همان‌طور که در شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، عامل F'_v/F'_m که تخمینی از بیشینه کارایی فتوسیستمII در یک شدت نور مشخص را نشان می‌دهد، با کاهش دمای یخزدگی تا ۱۲- درجه سانتی‌گراد تغییری پیدا نمی‌کند، اما با کاهش بیشتر دما این ویژگی کاهش شدید پیدا کرد. این نتیجه به این مفهوم است که کارایی در فتوسیستمII گیاه باقلا تا ۱۲- درجه سانتی‌گراد تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد و قابلیت انجام فعالیت فتوسنتزی به‌طور طبیعی را دارد. Nezami *et al*, (2011) با بررسی تحمل ژنوتیپ‌های عدس (*Lens culinaris* Medik.) گزارش کردند که F'_v/F'_m با کاهش دما از ۳- درجه سانتی‌گراد کاهش پیدا می‌کند.

مقدار F'_o در ساعات مختلف قبل و بعد از تنش یخزدگی اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول ۱). بررسی روند تغییرات F'_o قبل از اعمال تنش یخزدگی تا ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمارهای یخزدگی در برگ باقلا نشان داد که مقدار F'o در ساعات اولیه پس از اعمال یخزدگی روند نزولی داشت و این روند تا ۲۴ ساعت پس از تنش یخزدگی ادامه پیدا کرد و در ادامه ۴۸ ساعت پس از تنش به‌تدریج روند افزایشی نشان داد

(شکل ۳). بیشینه فلورسانس برگ سازگارشده به نور قبل از اعمال تنش یخزدگی تا ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش در باقلا تفاوت معنی‌داری نشان داد. همانند F'_o مقادیر F'_m نیز بعد از اعمال تیمارهای یخزدگی تا ۲۴ ساعت روند کاهشی داشتند و پس از آن روند افزایشی مشاهده شد (شکل ۳). اختلاف معنی‌دار آماری در مقدار F'_v در ساعات مختلف قبل و پس از تنش یخزدگی مشاهده شد (جدول ۱). فلورسانس متغیر قبل از اعمال تنش یخزدگی در بیشترین مقدار خود به سر می‌برد، اما با اعمال تنش یخزدگی مقدار F'_v روند کاهشی پیدا کرد و مانند سایر ویژگی‌های کلروفیل فلورسانس تا ۲۴ ساعت بعد از تنش این روند ادامه پیدا کرد و پس از آن با شیب ملایم افزایش پیدا کرد (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه تغییرات عوامل فلورسانس کلروفیل

(کمینه فلورسانس برگ سازگار شده به روشنایی (F'o)، بیشینه فلورسانس برگ سازگار شده به نور (F'_m)، فلورسانس متغیر (F'_v) (الف) و بیشینه کارآیی پتانسیل فتوسیستمII (F'_v/F'_m) (ب)) در دو توده باقلای بروجرد و نیشابور تا ۷۲ ساعت پس از تنش یخزدگی

خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد هستند.

Fig. 3. Comparison of chlorophyll fluorescence parameters

(minimum fluorescence light-acclimated leaves (F'o), maximum fluorescence light-acclimated leaves (F'_m), variable fluorescence (F'_v) (A), and maximum quantum yield of PSII photosystems light-acclimated leaves (F'_v/F'_m) (B) in two fava bean ecotypes until72 hours after freezing stress. Bar lines are the standard error.

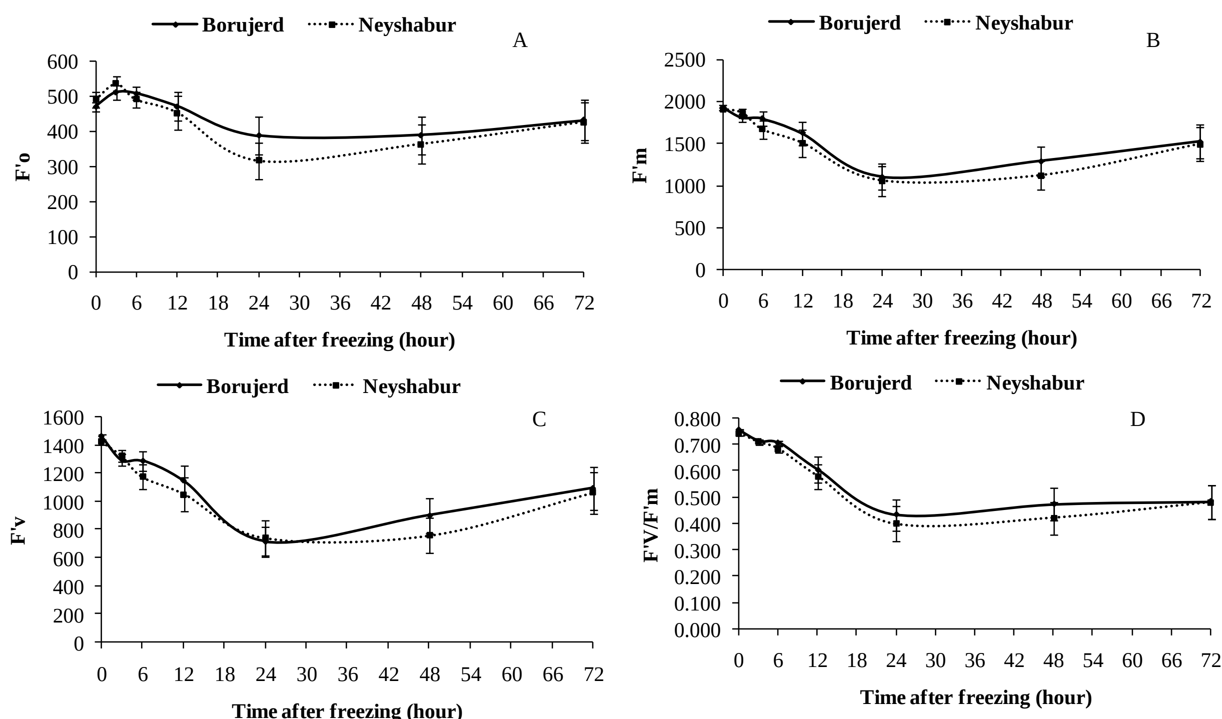
بیشینه کارایی در فتوسیستمII برگ باقلا در ساعات مختلف قبل و پس از تنش یخزدگی اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۱). کاهش F'_v/F'_m تا ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش یخزدگی با شیب تندی ادامه پیدا کرد و پس‌ازآن با شیب ملایم افزایش یافت، اما بیشینه کارآیی در فتوسیستمII، ۷۲ساعت پس از اعمال تنش یخزدگی هنوز به مقدار قبل از تنش نرسید (شکل ۳).

مطالعه روند تغییرات مؤلفه‌های مختلف کلروفیل فلورسانس قبل و بعد از اعمال تنش یخزدگی تا ۷۲ ساعت نشان داد که صدمه به فتوسیستمII دستگاه فتوسنتزی بلافاصله بعد از تنش یخزدگی صورت گرفت و در ساعات اولیه تنش روند کاهش کارایی فتوسیستمII و دستگاه فتوسنتزی شیب تندی نشان داد که تا ۲۴ ساعت بعد از تنش ادامه یافت. این کاهش کارایی فتوسیستمII بعد از ۲۴ ساعت متوقف و به‌تدریج شروع به بازیافت و روند افزایشی آن آغاز شد. با این وجود روند بازیافت دستگاه فتوسنتزی به‌طور نسبی کندتر از روند خسارت بود و ۷۲ساعت پس از تنش هنوز به حالت قبل از تنش برگشت پیدا نکرد. دلیل کاهش F'_v/F'_m تحت تأثیر تنش، افزایش فرود انرژی الکترون برانگیخته‌شده از مسیر غیرفتوشیمیایی (Non-photochemical quenching) که منجر به کاهش F'_m و درنتیجه آن غیرفعال‌شدن مراکز واکنش فتوسیستمII شده که منجر به افزایش F'_o (فلورسانس پایه یا کمینه برگ سازگار شده به روشنایی) می‌شود (Baker, 2008).

بررسی وضعیت دستگاه فتوسنتزی ازنظر فلورسانس کلروفیل در توده‌های مورد مطالعه قبل از تنش یخزدگی تا ۷۲ساعت پس از تنش نشان داد که کمینه فلورسانس برگ سازگارشده به روشنایی در توده نیشابور نسبت به توده بروجرد با شیب بیشتری کاهش پیدا کرد و این روند تا ۲۴ساعت پس از تنش ادامه یافت. در ادامه F'_o در هر دو توده شروع به افزایش کرد و در ۷۲ساعت پس از تنش به مقدار یکسانی رسیدند (شکل ۴). بیشینه فلورسانس برگ سازگارشده به روشنایی نیز در هر دو توده باقلا تا ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش یخزدگی کاهش یافت و پس از آن روند افزایشی پیدا کرد (شکل ۴). همانند F'_o مقدار F'_m در توده نیشابور در ۲۴ ساعت

اولیه بعد تنش یخزدگی کمتر از توده بروجرد بود. در ساعت۲۴ پس از تنش یخزدگی مقدار F'm در هر دو توده برابر گردید و پس از آن روند افزایش پیدا کرد، اما شیب سرعت بازیافت مقدار F'm در توده نیشابور بیشتر از توده بروجرد بود (شکل ۴). میزان فلورسانس متغیر در هر دو توده روند مشابه با F'm نشان داد (شکل ۴). F'v/F'm نیز مانند سایر مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل تا ۲۴ ساعت پس از تنش یخزدگی کاهش یافت و این کاهش در توده نیشابور بیشتر از توده بروجرد بود. شیب روند افزایشی بیشینه کارایی در فتوسیستمII در توده نیشابور بیشتر از توده بروجرد بود و ۷۲ ساعت پس از تنش هر دو توده مقدار F'v/F'm یکسانی دارا بودند (شکل ۴). این مطلب ممکن است از یک طرف صدمه‌پذیرتربودن و از طرف دیگر بازیافت سریع‌تر دستگاه فتوسنتزی در توده نیشابور نسبت به توده بروجرد در تنش یخزدگی را بیان کند.

فعالیت فتوسنتزی زیاد، گیاهان را در برابر صدمات ممانعت نوری فتوسنتزی ایجادشده در اثر سرما محافظت می‌کند (Jurczyk *et al*., 2013). تحمل به یخزدگی در ارتباط با تحمل در مقابل ممانعت نوری فتوسنتزی ایجادشده در اثر سرما است که این درنتیجه فرآیندهای عمومی سهیم در تطابق با تنش یخزدگی و ممانعت نوری فتوسنتزی تحت تأثیر سرما می‌باشد (Rapacz *et al*., 2011).



شکل ۴- عوامل فلورسانس کلروفیل

(کمینه فلورسانس برگ سازگار شده به روشنایی (**F'o**) (الف)، بیشینه فلورسانس برگ سازگار شده به نور (**F'm**) (ب)، فلورسانس متغیر (**F'v**) (ج) و بیشینه‌ی کارایی پتانسیل فتوسیستم **II** (**F'v/F'm**) (د)) در دو توده باقلای بروجرد و نیشابور تا ۷۲ ساعت پس از تنش یخزدگی

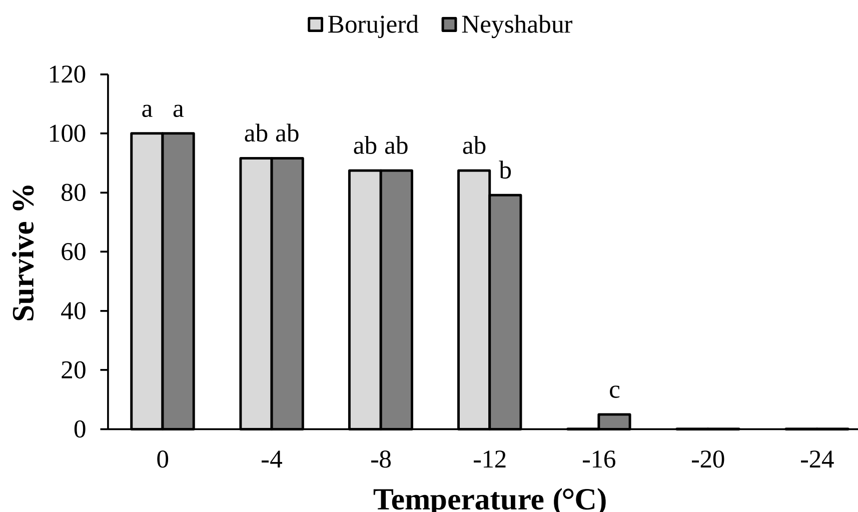
خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد هستند.

Fig. 4. Chlorophyll fluorescence parameters

(minimum fluorescence light-acclimated leaves (F'o) (A), maximum fluorescence light-acclimated leaves (F'_m) (B), variable fluorescence (F'_v) (C), maximum quantum yield of PSII photosystems light-acclimated leaves (F'_v/F'_m) (D) of two fava bean ecotypes until72 hours after freezing stress. Bar lines are the standard error.

بین توده‌های باقلا موردمطالعه ازنظر درصد بقاء سه هفته پس از تنش یخزدگی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. با افزایش شدت تنش یخزدگی درصد بقای نمونه‌ها کاهش یافت، به‌طوری‌که در دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد درصد بقا به ۸۳درصد رسید با کاهش دما از ۱۲- به ۱۶- درجه سانتی‌گراد درصد بقاء به‌شدت کاهش یافت. در این دما در توده بروجرد هیچ گیاهی باقی نماند و در توده نیشابور تنها پنج درصد از گیاهان قادر به تحمل این شدت از تنش یخزدگی بودند (شکل۵).

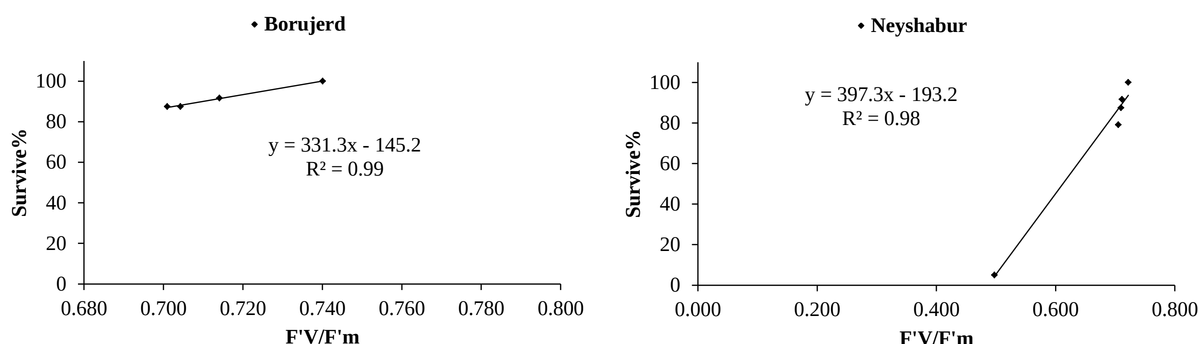
بررسی رگرسیونی بین بیشینه فلورسانس برگ سازگارشده به روشنایی و بقاء در دو توده باقلای بروجرد و نیشابور نشان داد که ضریب رگرسیونی بالا بین F'_v/F'_m و درصد بقاء وجود دارد و با کاهش F'_v/F'_m، درصد بقاء روند کاهشی نشان داد (شکل ۶). در تنش یخ‌زدگی اولین محلی که در گیاه صدمه می‌بینند فتوسیستمII است (Mathur *et al*., 2011).



شکل ۵- درصد بقاء در دو توده باقلای بروجرد و نیشابور در سطوح مختلف دمای یخ‌زدگی

Fig. 5. Survival rate at two fava bean ecotypes Borujerd and Neyshabur in freezing temperatures

وجود رابطه مستقیم بین بقاء و F'_v/F'_m در این مطالعه نشان می‌دهد بررسی صدمه به دستگاه فتوسنتزی و به‌ویژه فتوسیستمII می‌تواند به‌عنوان یک روش کارآمد در تعیین میزان خسارت و به‌گزینی ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعات پیشین نیز بین درصد بقای ژنوتیپ‌های مختلف عدس و نسبت F'_v/F'_m پیش از تیمار یخ‌زدگی رابطه رگرسیونی قوی (R^2=۰/۹۴**) گزارش‌شده است، ولی این رابطه در اندازه‌گیری‌های پس از اعمال تیمارهای یخ‌زدگی بسیار ضعیف بود (Nezami *et al*., 2011). در مطالعه دیگری مشاهده شد که اختلافات ژنوتیپی از نظر فرود غیرالکترون برانگیخته (NPQ) در ذرت (*Zea mays*) می‌تواند در انتخاب گیاهان متحمل به دماهای پایین مورد استفاده واقع شود (Koscielniak & Biesaga-Koscielniak, 2006). در گیاه آرابیدوبسیس در بوته‌های سازگارنشده به سرما بین تحمل به سرما و F_v/F_m همبستگی مشاهده نشد، اما F_v/F_m در گیاهان حساس، نیمه حساس و متحمل به سرمای آرابیدوبسیس متفاوت بود (Mishra *et al*., 2014). با توجه به نتایج حاصل از بقای توده‌ها در واقع می‌توان گفت که آستانه تحمل به یخ‌زدگی در دو توده باقلا مورد مطالعه ۱۲- درجه سانتی‌گراد است و در کمتر از این دما خسارت یخ‌زدگی گیاهان توده بروجرد ۱۰۰ درصد و توده نیشابور در دمای ۱۶- درجه سانتی‌گراد ۹۵ درصد بود.



شکل ۶- ارتباط بین نسبت F'_v/F'_m و درصد بقاء (۲۱ روز پس از تنش) در دو توده باقلای بروجرد و نیشابور تحت تنش یخ‌زدگی

Fig. 6. Relationship between F'_v/F'_m and survive percentage (21 days after freezing stress) in two fava bean ecotypes Borujerd and Neyshabur under freezing temperatures

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی هر دو توده باقلای بروجرد و نیشابور قادر به تحمل تنش یخزدگی تا ۱۲- درجه سانتی‌گراد بودند. عوامل فلورسانس کلروفیل با کاهش دما تا ۱۲- درجه سانتی‌گراد تغییر قابل ملاحظه‌ای نشان ندادند، اما با کاهش دما بیشتر از این مقدار روند کاهشی شدیدی نشان دادند. دستگاه فتوسنتزی باقلا تا ۲۴ساعت پس از اعمال تنش متأثر از تنش یخزدگی بود و کارآیی آن به شدت افت پیدا کرده بود، اما پس از این مدت به‌تدریج بازیافت خود را شروع نمود، اما با گذشت ۷۲ساعت به کارآیی قبل از تنش نرسید. در مجموع تجزیه و تحلیل عوامل فلورسانس کلروفیل در دو توده باقلا نشان داد که فلورسانس کلروفیل با بقاء، سه هفته پس از تنش یخزدگی رابطه مستقیمی دارد و می‌تواند به عنوان شاخصی برای بررسی میزان تحمل به یخزدگی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

هزینه اجرای این مطالعه از محل طرح مصوب با کد۴۰۰۶۳ در معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تأمین شده است که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌نماید.

منابع

1. Badeck, F.W., and Rizza, F. 2015.A Combined field/laboratory method for assessment of frost tolerance with freezing tests and chlorophyll fluorescence. Agronomy 5: 71-88.
2. Baker, N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. Annual Review of Plant Biology 59: 89-113.
3. Butler, W.L. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. Annual Review of Plant Physiology 29: 345-378.
4. Dexter, S.T. 1993. Effects of several environmental factors on hardening of plants. Plant Physiology 8: 123-139.
5. Ehlert, B., and Hincha, D.K. 2008. Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in Arabidopsis leaves. Plant Methods 4: 12.
6. FAOSTAT. 2009. Prod Stat: Crops. FAO Statistical Databases (Faostat), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), http://faostat.fao.org.
7. Hincha, D.K., and Schmitt, J.M. 1992. Freeze-Thaw Injury and Cryoprotection of Thylakoid Membranes. In: G.N. Somero, C.B. Osmond and C.L. Bolis (Eds). Water and Life. Springer, p. 316-337.
8. Jurczyk, B., Krepski, T., Kosmala, A., and Rapacz, M. 2013. Different mechanisms trigger an increase in freezing tolerance in *Festuca pratensis* exposed to flooding stress. Environmental and Experimental Botany 93: 45-54.
9. Kaplan, F., Kopka, J., Sung, D.Y., Zhao, W., Popp, M., Porat, R., and Guy, C.L. 2007. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. Plant Journal 50: 967-981.
10. Koscielniak, L., and Biesaga-Koscielniak, J. 2006. Photosynthesis and non-photochemical excitation quenching components of chlorophyll excitation in maize and field bean during chilling at different photon flux density. Photosynthetica 44: 174-180.
11. Krause, G., and Santarius, K. 1975. Relative thermostability of the chloroplast envelope. Planta 127: 285-299.
12. Krause, G.H., Grafflage, S., Rumich-Bayer, S., and Somersalo, S. 1988. Effects of freezing on plant mesophyll cells. Symposia of the Society for Experimental Biology 42: 311-327.
13. Lindow, S.E., Arny, D.C., and Upper, C.D. 1982. Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants. Plant Physiology 70: 1084-1089.
14. Mathur, S., Jajoo, A., Mehta, P., and Bharti, S. 2011. Analysis of elevated temperature induced inhibition of photosystem II using chlorophyll a fluorescence induction kinetics in wheat leaves (*Triticum aestivum*). Plant Biology 13: 1-6.
15. Mishra, A., Heyer, A.G., and Mishra, K.B. 2014. Chlorophyll fluorescence emission can screencold tolerance of cold acclimated *Arabidopsis thaliana* accessions. Plant Methods 10: 38.
16. Molina-Bravo, R., Arellano, C., Sosinski, B.R., and Fernandez, G.E. 2011. A protocol to assess heat tolerance in a segregating population of raspberry using chlorophyll fluorescence. Scientia Horticulturae 130: 524-530.
17. Nezami, A., Bagheri, A., Porsa, H., Zafranieh, M., and Khamadi, N. 2011. Evaluation of cold tolerant lentil genotypes (*Lens culinaris* Medik.) in fall planting under supplementary irrigation. Iranian Journal of Pulses Research 1(2): 49-58. (In Persian with English Summary).

18. Nezami, A., Khazaei, H.R., Eshghizadeh, H.R., and Riahinia, Sh. 2011. Evaluation of freezing temperature tolerance of lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes with using chlorophyll fluorescence parameters. Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 99: 24-33. (In Persian with English Summary).
19. Porsa, H., Nezami, A., Bagheri, A., and Najibnia, S. 2016. Agronomic assessment of cold tolerant chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes in fall sowing at Mashhad conditions. Iranian Journal of Pulses Research 7(1): 37-53. (In Persian with English Summary).
20. Rapacz, M., Sasal, M., and Gut, M. 2011. Chlorophyll fluorescence-based studies of frost damage and the tolerance for cold-induced photoinhibition in freezing tolerance analysis of triticale (× *Triticosecale* Wittmack). Journal of Agronomy and Crop Science. 197: 378–389.
21. Sharma, D.K., Andersen, S.B., Ottosen, C.O., and Rosenqvist, E. 2012. Phenotyping of wheat cultivars for heat tolerance using chlorophyll a fluorescence. Functional Plant Biology 39: 936-947.
22. Singh, A.K., Bhatt, B.P., Upadhyaya, A., Kumar, S., Sundaram, P.K., Singh, B.K., Chandra, N., and Bharati, R.C. 2012. Improvement of faba bean (*Vicia faba* L.) yield and quality through biotechnological approach: A review. African Journal of Biotechnology 11(87): 15264-15271.
23. Vaclavik, L., Mishra, A., Mishra, K.B., and Hajslova, J. 2013. Mass spectrometry-based metabolomic fingerprinting for screening cold tolerance in *Arabidopsis thaliana* accessions. Analytical and Bioanalytical Chemistry 405(8): 2671-2683.
24. Vogel, J.T., Zarka, D.G., van Buskirk, H.A., Fowler, S.G., and Thomashow, M.F. 2005. Roles of the *CBF2* and *ZAT12* transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. Plant Journal 41: 195-211.
25. Zhang, X., Wan, S., Hao, J., Hu, J., Yang, T., and Zong, X. 2016. Large-scale evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) germplasm for cold tolerance in the field during winter in Qingdao. The Crop Journal 4(5): 377-383.
26. Zhou, R., Yu, X., Kjær, K.H., Rosenqvist, E., Ottosen, C.O., and Wu, Z. 2015. Screening and validation of tomato genotypes under heat stress using Fv/Fm to reveal the physiological mechanism of heat tolerance. Environmental and Experimental Botany 118: 1–11.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 9, No. 2, 2018, p. 139-150

The trend of changes in chlorophyll fluorescence parameters in two *Vicia faba* ecotype during freezing stresses

Nabati[1*], J., Nezami[2], A., Hasanfard[3], A.R. & Haghighat Sheshvan[4], Zh.

1. Assistant Professor, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad
2. Professor, Faculty of Agriculture and Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, nezami@um.ac.ir

3&4. MSc. and Ph.D. Students, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, alireza.hasanfard@yahoo.com & haghighat.zhaleh@gmail.com, respectively

Received: 16 October 2016
Accepted: 13 March 2017

DOI: 10.22067/ijpr.v9i2.59524

Introduction

Freezing tolerance is an important factor determining natural geographic distribution of plant species as well as growth and yield of many crop plants. Many plants from temperate and cold climates, including several important crop species, are able to increase their freezing tolerance in response to low, nonfreezing temperatures in a process termed cold acclimation. It is generally accepted that cellular membranes are the primary targets of freezing damage in plants. So, besides whole plant survival, determination of electrolyte leakage from plant tissues after freezing and thawing, using conductivity measurements has been the most frequently used method reported in the literatures. This method mainly monitors the ability of the plasma membrane to function as a semi-permeable barrier towards intracellular ions, but the intactness of the vacuole, as the major storage compartment for inorganic ions, may also impact the measurements. Under stress conditions, the possibility of over excitation of photosystem II (PSII) increases, and this reduces the photosynthetic rate and lead to an increase in the dissipation of absorbed energy through nonradiative processes. The measurement of chlorophyll fluorescence has been used for many years as a sensitive, reliable, and rapid method to determine the effect of environmental stresses, like drought, temperature, excessive light and air pollution on green plants. Decrease of the maximal rate of the fast rise of fluorescence after exposure of leaves to chilling temperatures, correlated well with the visual symptoms of chilling injury in several species

Materials & Methods

This study was carried out to measure chlorophyll fluorescence and determine the survival of two *Vicia faba* ecotypes (Borujerd and Neyshabur) in the fall and winter of 2015 at Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad. Treatments were arranged as factorial based on completely randomized block design with four replications. Plants were grown in pots under natural conditions until four to six leaf stage for acclimation, and then were subjected to freezing temperatures (0, -4, -8, -12, -16, -20, -24 °C) in a thermo gradient freezer. Freezer temperature was 5 °C at the beginning and reached to -24 °C, decreasing two degrees centigrade per hour. Ice nucleation active bacteria was sprayed to nucleation formation in plants at -3°C. Plants were kept for an hour in each temperature and then were transported to a cold chamber (5±2 °C) and kept for 24 hours to avoid rapid melting. Chlorophyll fluorescence was recorded with a pulse amplitude modulation fluorometer (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Germany) before and 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hour after freezing stress. The efficiency of excitation energy capture by open PSII reaction centers (F'_v/F'_m) and the quantum yield of electron transport at photosystem II (PSII), were determined. Survival percentage was determined after three weeks recovery in greenhouse condition. Data were analyzed using a two-way ANOVA model, followed by Duncan' s test for mean comparison at 95 % confidence level by Minitab 16 program.

***Corresponding Author:** jafarnabati@um.ac.ir

Results & Discussion

Result indicated that maximum quantum yield of PSII photochemistry (F'_v/F'_m) was four percent higher in Borujerd ecotype compared to Neyshabur ecotype. No significant change was found in chlorophyll fluorescence parameters with decreasing temperature from zero to -12°C but more temperature reduction caused chlorophyll fluorescence parameters to decrease in a way that the lowest mean was observed at -24°C. Rapid reductions were found in chlorophyll fluorescence parameters such as F'_v/F'_m until 24 hours after freezing stress which was followed by gently slope increasing trend, but the photochemical efficiency of photosystem II, 72 hours after stress, did not return to the level before freezing stress. Survival rate was decreased as freezing temperature decreased and reached to 83% at -12°C. More temperature reduction to -16°C led to sever decrease in survival rate in a way that no plant survival and only five percent was observed in Borujerd and Neyshabur ecotypes, respectively. High regression coefficients were found between F'_v/F'_m and survival rate in both ecotypes (R^2=0.99 and R^2=0.98 for Borujerd and Neyshabur ecotypes, respectively)

Conclusion

Generally, evaluation of chlorophyll fluorescence parameters of both *Vicia faba* ecotypes showed that chlorophyll fluorescence has a direct relationship with survival three weeks after freezing stress and can be used as an index for assessment of freezing tolerance.

Keywords: Photochemical efficiency, Photosystem, Quantum yield, Survival